

УДК 619:616-07

СХЕМА УСКОРЕННОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ РОДА *PROVIDENCIA*

*Н.Г. Барт, кандидат биологических наук, доцент,
Тел.8(8422) 55-95-47, bart1967@mail.ru,
С.Н. Золотухин, доктор биологических наук, профессор,
Тел.8(8422) 55-95-47, fvm.zol@yandex.ru,
Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор,
Тел.8(8422) 55-95-47, dav_ul@mail.ru
ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА*

Ключевые слова: бактериофаги, идентификация, контаминация, патогенность, микроорганизмы.

Работа посвящена ускоренной идентификации бактерий рода *Providencia*, фагоидентификации и идентификации по биохимическим свойствам. При проведении исследований авторами установлено, что фагоидентификация в сравнении с традиционной схемой, изложенной в методических указаниях, позволила сократить сроки исследования в два раза.

Введение. Выделение и идентификация бактерий рода *Providencia* в основном проводится бактериологическим методом. Трудоемкость и длительность изучения биологических свойств бактерий не позволяет быстро идентифицировать бактерии рода *Providencia*. Существующие современные высокоспецифичные методы лабораторной диагностики (ИФА, РИА, ПЦР) из-за сложности методик, высокой стоимости оборудования и реактивов недоступны для большинства лабораторий. В связи с выше изложенным возникает необходимость изыскания эффективных и доступных для ветеринарных лабораторий методов индикации и идентификации бактерий рода *Providencia* [1].

Материалы и методы исследований. Материалом для исследований явились два бактериофага F-87 и F-67 серии УГСХА, были использованы как гомологичные, так и гетерологичные штаммы бактерий [2], для выращивания микроорганизмов и проведения бактериологических исследований в работе использовали питательные среды. Подготовку и посев проб материала, подлежащего исследованию, проводили в соответствии с ГОСТами «Методы бактериологического анализа». В качестве материала для исследований использовали воду, комбикорм, мясо и фекалии контаминированные бактериями рода *Providencia* в концен-

трациях 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 м.к. в 1 мл.

Результаты исследований и их обсуждение. Учитывая строгую специфичность отобранных бактериофагов F-87 и F-67 серии УГСХА по отношению к штаммам провиденций [3], мы разработали схему ускоренной идентификации данных микроорганизмов (рис. 1).

Выделение и идентификацию чистых культур микроорганизмов проводили в соответствии с правилами, изложенными в «Методических указаниях по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями», утвержденными Департаментом ветеринарии МСХ и П 11 октября 1999 года.

Посев материала производили на дифференциально-диагностические среды (ДДС): Эндо, Плоскирева, Левина, инкубировали при температуре 37 °С 18-20 часов. На среде Эндо отбирали колонии разного вида, в основном характерные лактозоположительные, частично сливающиеся слизистые колонии малинового цвета с металлическим блеском или без него; на среде Плоскирева колонии розового или бежевого цвета; на среде Левина – сине-фиолетовые. Для дальнейшего изучения отобранные колонии с чашек пересевали в МПБ, МПА и инкубировали в термостате при 37 °С 6-18 часов, до появления выраженного помутнения среды. Первичные бульонные культуры, полученные после посева колоний с дифференциально-диагностических сред, микроскопировали (окраска по Граму) и при обнаружении в мазках однородных мелких грамотрицательных палочек с закругленными концами, располагающихся единично парами или короткими цепочками, подвергали фагоидентификации и идентифицировали по биохимическим свойствам [4].

Биохимические свойства выделенных штаммов изучали в соответствии с выше упомянутыми методическими указаниями. По результатам изучения биохимических свойств определили родовую принадлежность культур (табл. 1).

Фагоидентификацию проводили: на поверхность МПА в чашки Петри пипеткой наносили 3-4 капли бульонной 6-18 часовой культуры исследуемых микроорганизмов. Нанесенную культуру равномерно распределяли по поверхности среды стерильным шпателем. Чашки ставили в термостат для подсушивания газона на 15 – 20 минут. Дно чашки маркером делили на три сектора: на поверхность засеянной среды первого и второго секторов, пипеткой легким прикосновением капли, наносили по одному штамму фагов, на третий сектор по центру в каче-

Таблица 1 – Идентификация выделенных штаммов бактериологическим методом

Объекты исследования	Обозначение пробы	Тесты										Род и вид микроорганизмов
		образование H ₂ S	подвижность	цитрат Симмонса	р-я фогес-Проскауэра	р-я с метилротом	образование индола	ацетат	малонат	фенилаланин	сорбит	
вода	1 в	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>E. coli</i>
	2 в	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	<i>Providencia spp.</i>
	3 в	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	<i>Citrobacter spp.</i>
комби-корм	1 к	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>E. coli</i>
	2 к	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	<i>Providencia spp.</i>
	3 к	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	<i>Citrobacter spp.</i>
фекалии	1 ф	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	<i>Proteus spp.</i>
	2 ф	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	<i>Serratia spp.</i>
	3 ф	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	<i>Providencia spp.</i>
	4 ф	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>E. coli</i>
	5 ф	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	<i>Proteus spp.</i>
	6 ф	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>E. coli</i>
мясо	1 м	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	<i>Providencia spp.</i>

стве контроля наносили стерильный МПБ, наклоняли чашку, чтобы капли стекли. Чашки оставляли для подсушивания в боксе на 15-20 минут, затем помещали в термостат в перевернутом виде на 18-24 часа при 37 °С [5].

Результат исследований считали положительным, если на месте нанесения хотя бы одного штамма фагов на газоне сплошного роста культуры образовывалась прозрачная зона лизиса фага. Отрицательным считали результат при отсутствии лизиса на газоне роста исследуемой культуры микроорганизмов [6]. При положительном результате

Таблица 2 – Фагоидентификация выделенных штаммов

Исследуемый объект	Обозначение пробы	F-87 УГСХА	F-67 УГСХА	Результат фагоидентификации	Результаты идентификации по биохимическим свойствам
вода	1 в	–	–	–	<i>E. coli</i>
	2 в	+	+	Providencia	<i>Providencia spp.</i>
	3 в	–	–	–	<i>Citrobacter spp.</i>
комбикорм	1к	–	–	–	<i>E. coli</i>
	2к	–	+	Providencia	<i>Providencia spp.</i>
	3к	–	–	–	<i>Citrobacter spp.</i>
фекалии	1 ф	–	–	–	<i>Proteus spp.</i>
	2 ф	–	–	–	<i>Serratia spp.</i>
	3 ф	+	+	Providencia	<i>Providencia spp.</i>
	4 ф	–	–	–	<i>Citrobacter spp.</i>
	5 ф	–	–	–	<i>E. coli</i>
	6 ф	–	–	–	<i>Proteus spp.</i>
	7 ф	–	–	–	<i>E. coli</i>
мясо	1 м	+	–	Providencia	<i>Providencia spp.</i>
Время, затраченное на исследование, час				48	96

Таблица 3 – Обнаружение бактерий рода *Providencia* в разных концентрациях бактериологическим методом

Объекты исследования	Количество микробных клеток в 1 мл (г)				
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵
Вода	–	–	–	+	+
Мясо	–	–	–	+	+
Комбикорм	–	–	–	+	+
Фекалии	–	–	–	–	+

Примечание: «+» – положительный результат, «–» – отрицательный результат.

культуру относили к роду *Providencia*. При отрицательном результате проводили изучение ферментативных свойств выделенных микроорганизмов. Результаты исследований представлены в таблице 2. Фагоидентификация выделенных штаммов бактерий рода *Providencia* во всех объектах подтверждена результатами исследований биохимических свойств [7].

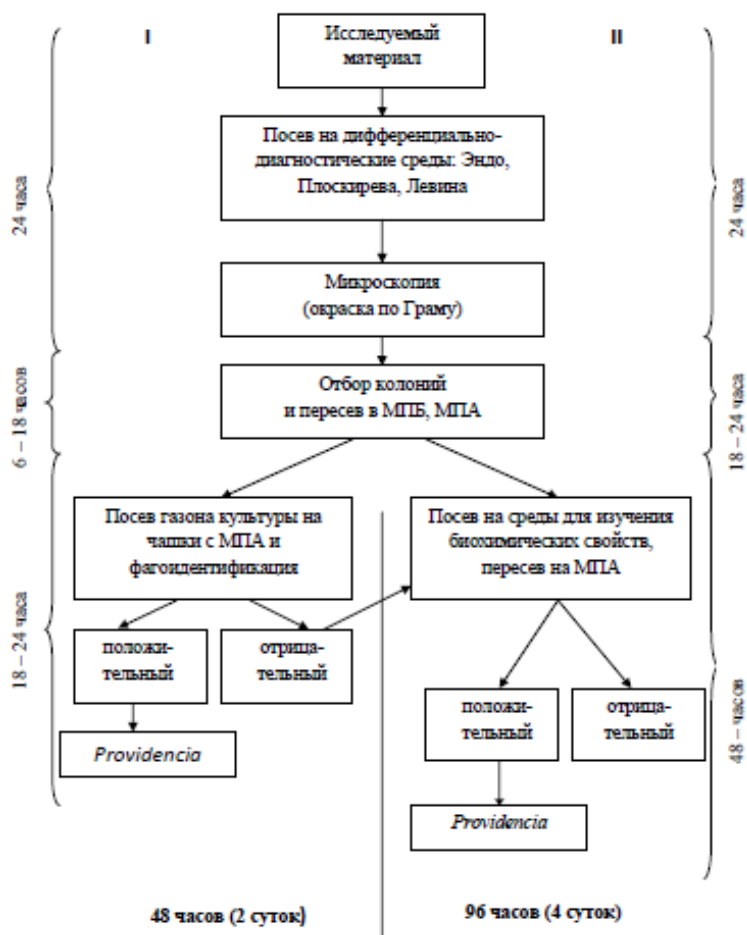


Рисунок 1 - Выделение и ускоренная идентификация бактерий рода *Providencia* с помощью бактериофагов (I) в сравнении со схемой бактериологического исследования (II)

Одновременно были проведены исследования по определению минимальной заражающей концентрации микробных клеток бактерий рода *Providencia* в исследуемых объектах, при которой возможно обнаружить культуру бактериологическим методом [8].

Заключение. По результатам данных исследований заражающая концентрация микробных клеток бактерий рода *Providencia* в объектах исследования составила 10^4 м.к./мл. При исследовании фекалий чувствительность понижается до 10^5 м.к./мл из-за обильной обсемененности посторонней микрофлорой.

Таким образом, схема фагоидентификации в сравнении с традиционной схемой, изложенной в вышеупомянутых методических указаниях, позволяла сократить сроки исследования в два раза, результат получали спустя 48 часов (2 суток) с меньшими затратами посуды и реактивов. В то время как бактериологическим методом время исследования занимало 96 часов (4 суток).

Библиографический список

1. Барт Н.Г. Разработка методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных заболеваний с использованием биопрепарата на основе бактериофагов *Providencia* / Н.Г. Барт, А.С.Мелехин // Ветеринарная медицина XXI века: инновации, опыт, проблемы и пути их решения : Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной Всемирному году ветеринарии в ознаменование 250-летия профессии ветеринарного врача. – Ульяновск, 2011. – С. 46-48.
2. Барт Н.Г. Выделение фагов бактерий рода *Providencia* из объектов внешней среды и патологического материала / Н.Г. Барт, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Труды Всероссийского совета молодых ученых аграрных образовательных и научных учреждений. – Москва, 2008. – С. 92-95.
3. Барт Н.Г. Биотехнологические аспекты разработки фагового препарата для индикации и идентификации бактерий рода *Providencia* / автореферат дис. ...кандидата биологических наук: 03.01.06, 03.02.03 / н.гос.с.-х. акад. Им. П.А. Столыпина. – Ульяновск, 2013.
4. Барт Н.Г. Разработка схемы исследования материала с целью выделения и ускоренной идентификации бактерий рода *Providencia* / Н.Г. Барт, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Актуальные вопросы аграрной науки и образования: Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 65-летию Ульяновской ГСХА. – Ульяновск, 2008. – С. 22-24.
5. Барт Н.Г. Разработка оптимального метода выделения диагностического препарата / Н.Г. Барт, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Молодежь и наука XXI века: Материалы II Открытой Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых. –2007. – С. 34-35.
6. Васильев Д.А. Разработка схемы исследования материала с целью выделения и ускоренной идентификации бактерий рода *Providencia* / Д.А. Васи-

- льев, Н.Г. Барт, С.Н. Золотухин, Д.Ю.Акимов // Молодежь и наука XXI века: Материалы III-й Международной научно-практической конференции молодых ученых. –2010. – С. 4-5.
7. Васильев Д.А. Стандартизация и контроль безопасности и качества лекарственных средств и кормов для животных / Д.А.Васильев, Н.В.Силова, Н.Г.Барт // Методические указания для студентов очного ветеринарного факультета специализация «Ветеринарно-санитарный эксперт». – Ульяновск, 2012.
 8. Садртдинова Г.Р. Биохимические тесты для ускоренной внутриродовой детекции бактерий *Klebsiella*/ Г.Р.Садртдинова, Д.А.Васильев//Sci-article. 2015.№17.с.11-15.

THE SCHEME OF THE ACCELERATED IDENTIFICATION SORT PROVIDENCIA BACTERIA

Bart N. G. , S. Zolotukhin N. , Vasilyev D. A.

Keywords: *bacteriophages, identification, contamination, pathogenicity, microorganisms.*

Work is devoted to the accelerated identification of bacteria of the sort Providencia, a fagoidentifikation and identification on biochemical properties. When carrying out researches by authors it is established that the fagoidentifikation in comparison with the traditional scheme stated in methodical instructions has allowed to reduce research terms twice.